

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III



**Efectos de un suplemento dental en gatos jóvenes
sobre la microbiota asociada a enfermedades
periodontales**

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

Maigualida Cuenca Caraballo

TUTOR: Prof. David Herrera González

Madrid, 2017

AGRADECIMIENTOS

A Dios, quien siempre me acompaña y me levanta.

Mi agradecimiento a la Universidad Complutense de Madrid, por la oportunidad y ayuda concedida, dando así continuidad a los estudios de Máster en tan prestigiosa y reconocida institución.

No olvido a la Sra. Marta Amador López, Coordinadora del Plan de Acogida a Personas Refugiadas, por su compañía, asesoría y colaboración en este proceso.

El presente Trabajo Final de Máster es fruto de las orientaciones, sugerencias, estímulo y gran experiencia del profesor David Herrera, mi respeto y admiración. Él me ha conducido durante este tiempo de manera paciente, abierta y generosa. Le agradezco su paciencia y su forma de guiarme, sin ser directivo y aportando valiosas observaciones llenas de enseñanzas. Sin duda, ha sido una de las mejores experiencias en el ámbito educativo, donde la combinación del trabajo de laboratorio como aspecto práctico, la búsqueda de información, las correcciones y las recomendaciones recibidas, hicieron su labor, abrir la curiosidad a esta bonita rama de la ciencia como lo es la investigación.

También, quiero dar las gracias al equipo del Laboratorio de Investigación de la UCM compuesto por Ana O'Connor y Marta García, por su valiosa colaboración y la enseñanza de forma responsable y muy amena en Microbiología. Así como a María José Marín, quien fue mi guía inicial respecto a conceptos básicos y necesarios puestos en práctica durante la realización del trabajo, y a María Sánchez, por sus consejos y comentarios. Gracias a todas ellas por la ayuda que me han brindado y todos los conocimientos básicos que me han facilitado para trabajar en el laboratorio.

Por último, agradecer a quienes en la distancia están conmigo de corazón, son mi energía y apoyo Rodolfo, Evelia y Jean-Michel, los amo.

ÍNDICE

RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Enfermedades periodontales en humanos	7
1.2. Enfermedades periodontales en gatos	9
1.3. Etiología de las enfermedades periodontales:		
<i>biofilms</i> bacterianos	13
1.4. Etiología de las enfermedades		
periodontales: especies bacterianas		
asociadas a enfermedad	14
1.5. Procedimiento de análisis microbiológico de		
bacterias periodontales en gatos	18
2. JUSTIFICACIÓN	20
3. OBJETIVOS	22
4. HIPÓTESIS	23
5. MATERIAL Y MÉTODOS	24
5.1. Diseño del estudio y animales empleados	24
5.2. Tratamiento	25
5.3. Visitas y evaluaciones	25

5.4.	Procedimiento del muestreo	26
5.5.	Procesado de las muestras	27
5.6.	Análisis estadístico	28
6.	RESULTADOS	29
6.1.	Recuentos totales de aerobios y anaerobios	29
6.2.	Frecuencia de detección de las especies bacterianas estudiadas	30
6.3.	Recuentos de las especies bacterianas estudiadas	31
6.4.	Proporciones sobre la flora total de las especies bacterianas estudiadas	32
7.	DISCUSIÓN	34
8.	CONCLUSIONES	37
9.	REFERENCIAS	38
	FIGURAS	44

RESUMEN

Introducción: Las enfermedades periodontales en gatos tienen una alta prevalencia, y debido a su etiología infecciosa, las bacterias implicadas podrían ser transmisibles al ser humano. El género de bacterias más estudiado es *Porphyromonas* spp., ya que se encuentra asociado a la severidad de la enfermedad.

Objetivo: El propósito de este estudio ha sido evaluar el impacto microbiológico de la administración de un suplemento dental en gatos jóvenes con enfermedades periodontales, para establecer un tratamiento no invasivo que permitan disminuir la presencia de bacterias bucales en los animales de compañía.

Material y Métodos: Se diseñó un estudio clínico aleatorizado controlado cruzado. Catorce gatos fueron clínicamente evaluados y muestreados bajo sedación. El tratamiento objeto de estudio fue un suplemento dental que incluía ingredientes activos contra la placa dental, el cálculo y mal olor oral. El control fue la misma matriz, pero sin ingredientes activos. Se recogieron muestras de la zona subgingival agrupadas de cuatro localizaciones. Las muestras fueron cultivadas en medio de cultivo agar sangre e incubadas bajo condición aeróbica y anaeróbica, para finalmente realizar recuentos de colonias bacterianas de interés.

Resultados: Se observaron pocos cambios en el aspecto microbiológico. Los recuentos totales anaerobios mostraron un aumento estadísticamente significativo entre grupos, con un mayor incremento en el grupo control (-1,95) respecto al grupo al que se aplicó el tratamiento (-1,61). La frecuencia de detección mostro incremento de *P. gingivalis*-like (71,4%) y *P. intermedia*-like (85,7%). Lo contrario ocurrió para *F. nucleatum* (50,0%), donde la frecuencia disminuyó. La cantidad total de bacterias y especies bacterianas aumento en ambos grupos, con un mayor incremento en el grupo test *P. intermedia*-like, *F. nucleatum* y *T. forsythia*, para *P. gingivalis*-like el incremento fue mayor en el grupo control que en el grupo test. La proporción de la flora total de las

especies bacterianas aumentó en ambos grupos, siendo la más elevada *P. intermedia*-like en el grupo control y *P. gingivalis*-like en el grupo tratado.

Conclusiones: El estudio confirmó pocos cambios microbiológicos, y una tendencia a aumentar de las especies bacterianas.

Palabras Clave: periodontitis, *Porphyromonas gulae*, gatos, estudio cruzado, suplemento dental.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades periodontales en humanos

La caries dental y la periodontitis son enfermedades bucales de elevada prevalencia, siendo las principales causas de la pérdida dentaria en el hombre (Pihlström y cols., 2005). Las enfermedades periodontales son un problema de salud pública en todo el mundo (Carasol y cols., 2016). Un estudio reciente indica que la periodontitis severa es considerada como la sexta patología más común a nivel global (Frencken y cols., 2017). La prevalencia se ha estimado desde un 47% en adultos con más de 30 años, llegando hasta un 85% en personas mayores de 65 años (Chung y cols., 2011; Eke y cols., 2012). Otro estudio indica que las enfermedades periodontales son más frecuentes en el sexo masculino con una tendencia a empeorar a los 45 años, y está adicionalmente relacionada al tabaco (Carasol y cols., 2016). También han informado de que las formas más leves de periodontitis afectan incluso a un mayor porcentaje de adultos (Dye, 2012; Petersen y Ogawa, 2012).

Las enfermedades periodontales son de naturaleza infecciosa y afectan a los tejidos de soporte del diente. La principal división entre las enfermedades se describe como gingivitis y periodontitis (Armitage, 1999). La gingivitis es la forma más común, siendo definida como una reacción inflamatoria reversible de los tejidos supraalveolares ante la acumulación de placa bacteriana. El aumento de la evidencia en diferentes campos de la investigación dental ha indicado que los depósitos bacterianos orales desempeñan un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de las enfermedades periodontales (Löe y cols., 1965). Por su parte, la periodontitis es definida como una enfermedad compleja de origen infeccioso que se caracteriza por la inflamación de la encía y el periodonto de soporte, afectando de manera significativa el tejido conectivo gingival, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. Esta enfermedad produce la destrucción del periodonto y puede causar, en última instancia, la pérdida del diente. Aparece acompañada de sangrado al sondaje, formación de bolsa periodontal, pérdida de inserción y pérdida ósea radiográfica. Estos signos son necesarios para diagnosticar la periodontitis, y a

su vez permite diferenciarla de la gingivitis (Löe y cols., 1965). Otra definición de periodontitis la describe como una enfermedad inflamatoria crónica que aparece como resultado de una infección polimicrobiana compleja en individuos susceptibles, conduciendo a la destrucción de los tejidos periodontales como consecuencia de una perturbación de la homeostasis entre la microbiota subgingival y las defensas del huésped (Armitage, 2005; Sanz y Van Winkelhoff, 2011).

El impacto de la periodontitis no se limita solo a la cavidad bucal, con la mencionada pérdida de dientes y sus consecuencias funcionales, de masticación, estéticas o sociales; en los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia de la misma en la salud general, asociándose la periodontitis a importantes patologías sistémicas, destacando diabetes mellitus o enfermedades cardiovasculares (Linden y Herzberg, 2013).

Las enfermedades periodontales no son exclusivas de los seres humanos, sino que también se ven afectados los animales salvajes y domésticos, siendo gatos y perros dos de las especies con mayor predisposición a la enfermedad. De hecho, se considera la condición oral más común observada en pequeños animales (Gorrel, 1998).

A pesar de que la Odontología Veterinaria es una especialidad reciente, las enfermedades periodontales están entre los problemas más frecuentes que afectan a los animales domésticos, siendo estas conocidas desde hace más de setenta años. Una publicación refiere que entre un 53 - 95% de perros mayores a un año, tienen cierto grado de periodontitis, y estudios realizados en gatos indican una prevalencia de enfermedades periodontales del 25-50%, documentando así la importancia de esta enfermedad (Watson, 1994).

1.2. Enfermedades periodontales en gatos

El gato, además de satisfacer necesidades de orden afectivo, desempeña un rol importante en el control natural de los roedores (Acuña, 1998). Sin embargo, tanto la especie canina como felina presentan aspectos negativos, siendo una de las principales la zoonosis, por la estrecha interacción de perros y gatos con el grupo familiar (Landeros, 1988). Algunas de las zoonosis más importantes son la rabia (dentro de las enfermedades virales), algunas parasitosis (toxocariasis, dipilidiasis, hidatidosis y toxoplasmosis), ciertas enfermedades bacterianas (brucelosis, erlichiosis, leptospirosis, tuberculosis, enfermedad de Lyme y enfermedad del Rasguño del gato) y fungosis (microsporidiosis y tricofitosis) (Groves y cols., 2000). Adicionalmente, el estudio de las especies bacterianas presentes en la boca asociadas a enfermedades periodontales en gatos es importante, no sólo para la prevención, el diagnóstico y tratamiento, sino también porque la presencia de bacterias en animales de compañía es un reservorio de periodonto-patógenos (Booij-Vrieling y cols., 2010).

Las enfermedades periodontales en gatos engloban un número de condiciones inflamatorias que afectan al periodonto (Harvey y cols., 1983; Gorrel, 1998) y se deben a la presencia crónica de las bacterias en la unión entre dientes y encía (Slatter, 1997). Además, son inducidas por la placa dental, la cual afecta al tejido de soporte del diente. En cuanto al tipo de lesiones que se asocian a las enfermedades periodontales, incluye la gingivitis, periodontitis, abscesos periapicales y osteomielitis; según afecte a la encía, al ligamento periodontal o al hueso alveolar (Dillon, 1989). También existen formas juveniles de estas afecciones como la gingivostomatitis crónica (Perry y Tutt, 2015). Las enfermedades periodontales son de evolución episódica, en las cuales se presentan periodos de destrucción tisular activa, seguidos por otros de inactividad y cicatrización. Este proceso no afecta a todos los dientes en el mismo grado ni a la misma velocidad (Logan y cols., 2000).

Son varios los factores que influyen sobre la salud periodontal de los gatos, incluyendo la especie, raza, genética, edad, conducta de masticación, dieta,

oclusión, cuidados caseros, estado de salud general, frecuencia de atención dental profesional, flora bacteriana presente en la cavidad bucal y los hábitos de acicalamiento y la impactación de los pelos alrededor del diente y en el surco gingival (Holmstrom, 1998).

La gingivitis es descrita como una condición reversible, la cual una vez controlada, remite y detiene el avance de la enfermedad. Este hecho puede ocurrir tras 2-3 semanas si el biofilm de la placa no es eliminado. Lo contrario ocurre con la periodontitis, que es una enfermedad irreversible y de condición progresiva, ya que conlleva la destrucción de los tejidos de soporte (Perry y Tutt, 2015). La periodontitis puede causar incomodidad al animal, dolor crónico y anorexia, por lo que la infección puede afectar a otras partes del cuerpo (Nieves y cols., 1997; Pérez-Salcedo y cols., 2015). En algunos casos, se presentan procesos sistémicos como consecuencia de bacteriemias de origen periodontal, lo que puede producir endocarditis bacterianas, artritis sépticas, lesiones renales, bacterias del tracto respiratorio y un desmejoramiento del estado del animal en general que puede llevar a una muerte temprana (Harvey y Flax, 1992; DuPont, 1998; Remeus, 1999; Grandez y Guerrero, 2013).

La gingivitis, se manifiesta clínicamente como hinchazón, rubor, hipersensibilidad y a menudo sangrado del margen gingival (Slatter, 1997). La encía responde con inflamación, es decir, vasodilatación, migración leucocitaria, celular y edema. En una gingivitis establecida existe halitosis (DeBowes, 2002; Gioso, 2003).

Por otra parte, la periodontitis se manifiesta clínicamente por inflamación profunda y destrucción de la fijación de tejido conectivo fibroso al diente. Además de presentar gingivitis, puede cursar con recesión gingival, bolsas periodontales, pérdida de hueso alveolar, exposición de raíces y la aparición temprana de la furcación dental, movilidad dentaria, halitosis marcada, sangrado gingival espontáneo o con abrasiones mínimas y la eventual pérdida del diente (DeBowes, 2002; Niemiec, 2008). La pérdida temprana del diente es resultado de la periodontitis progresiva, en la cual son los incisivos y premolares los primeros dientes en perderse (Frost y Williams, 1986).

La identificación de las enfermedades periodontales debe realizarse de forma temprana, a través de un examen minucioso de la cavidad oral por medio de un sondaje periodontal. Estas enfermedades son consideradas silenciosas, que a menudo progresan sin signos clínicos manifiestos tanto para la mascota como para el dueño. El avance de la enfermedad a periodontitis provoca dolor y disfunción oral, por lo que el animal tiende a presentar incomodidad conduciendo a muchos cambios que van desde los hábitos alimenticios llegando a presentar anorexia, bajo peso, halitosis, hasta cambios generales de comportamiento y carácter como la renuencia a la pareja y la socialización o sutiles signos de depresión, pudiendo llegar a estar triste, apático o inclusive ser agresivo (Logan, 2006). La presencia de las enfermedades periodontales en gatos provoca serias secuelas locales y sistémica, por lo que el estudio, identificación y tratamiento se hace interesante.

El objetivo del tratamiento va direccionado a controlar la inflamación del tejido, devolviendo a la encía salud clínica, y a la prevención de la destrucción del periodonto en otras zonas de la boca. Por tanto, la gingivitis, como se mencionó antes, es esencialmente una condición reversible ya que, cuando se elimina el *biofilm* supragingival, la inflamación se puede controlar. La enfermedad, sin embargo, puede progresar hasta generar periodontitis, la cual afecta al aparato (cemento, hueso alveolar y ligamento periodontal). Con base en lo anterior, se debe eliminar los depósitos de placa y cálculo, utilizando instrumentos manuales solos o una combinación de sonidos o ultrasonidos (aunque rápido no deja de ser una técnica invasiva) y los instrumentos manuales. La limpieza manual es tan eficaz como la limpieza ultrasónica, aunque implica más tiempo y fatiga. Se deben eliminar durante el tratamiento los depósitos supra y subgingivales (Perry y Tutt, 2015). Por su parte, se ha sugerido que la limpieza supragingival con instrumentos automáticos y los instrumentos manuales son el primer paso en el proceso de la terapia. Siendo el siguiente paso, el raspado subgingival, el cual es necesario para eliminar las bacterias que están en contacto directo con el periodonto (Cleland, 2000).

Los cuidados domésticos son importantes en el tratamiento periodontal en animales de compañía como en los humanos. Existen dos tipos de cuidados

dentales que son realizados en casa, dentro del cual los activos son los de referencia. Los cuidados activos consisten en cepillar los dientes del animal una vez al día, usando un cepillo blando infantil y una pasta dentífrica veterinaria. Cuando los animales tienen problemas periodontales, la frecuencia del cepillado es 3 veces a la semana. Los cuidados pasivos se caracterizan por administrar dietas específicas donde el objetivo es masticar. Este último es muy sencillo y no requiere trabajo para el cuidador (Niemiec, 2008).

La prevalencia de las enfermedades periodontales en gatos es muy elevada, ya que afecta a un 70% de los gatos jóvenes de entre 20 y 27 meses de edad, y un 85% a los mayores de 6 años (Harvey, 2005; Niemiec, 2008). En un estudio transversal con 15.226 gatos observados durante consultas privadas en EE. UU, el diagnóstico más común fue la presencia de cálculo dental con un 24,2%, seguido de la gingivitis con un 13,1% (Cave, 2012; Perry y Tutt, 2015).

Un análisis más detallado realizado por veterinarios especializados en Odontología confirma la gran prevalencia de las enfermedades orales. En la población estudiada de 753 gatos, el 73% padecía gingivitis, el 67% cálculo dental, el 28% pérdidas dentarias, el 25% reabsorciones dentales, el 19% periodontitis grave, el 12% estomatitis y el 11% fracturas dentales (Pibot y cols., 2009).

En otro estudio transversal en Inglaterra con 3.584 gatos, el diagnóstico más frecuente fue periodontitis con 13,9%. Así mismo un estudio con 109 gatos sanos bajo anestesia, a los que se les realizó examen clínico y radiografía dental, tuvo como resultado que sólo el 4% de los gatos estaban libres de inflamación periodontal, el 62% presentaron hemorragia al sondaje y el 13% mostraron periodontitis agresiva (Perry y Tutt, 2015).

1.3. Etiología de las enfermedades periodontales: biofilms bacterianos

La definición que se ha manejado durante mucho tiempo de la placa dental bacteriana ha sido redefinida con el concepto de *"biofilm"*, el cual es descrito como comunidades de microorganismos que se adhieren a superficies naturales y artificiales, asociadas a ambientes acuosos con una concentración de nutrientes necesaria para mantener las necesidades metabólicas de la comunidad bacteriana (Costerton y cols., 1995; Lasa y cols., 2005). Las enfermedades periodontales en gatos representan la respuesta inflamatoria del huésped a bacterias de la placa, estas son parte del *biofilm*, donde las bacterias se unen a la superficie del diente y se multiplican. Por tanto, la principal causa de gingivitis y periodontitis es la presencia de *biofilm* en las superficies de los dientes (Gorrel, 1998). El *biofilm*, macroscópicamente, es un depósito blando, pudiendo ser opaco, blanco o gris y no es visible a simple vista, excepto cuando es abundante (Perry y Tutt, 2015). Los premolares y molares son los primeros dientes que muestran acumulación de placa (Frost y Williams, 1986).

Los componentes bacterianos que contribuyen al avance de la enfermedad a periodontitis, se han identificado como factores virulentos; algunos como las fimbrias permiten a las bacterias colonizar e invadir los tejidos del huésped, mientras que otros causan daño al tejido del huésped (producción de enzimas proteolíticas como la colagenasa, por ejemplo). En parte, la acción de los componentes bacterianos en el avance de la periodontitis puede deberse a la estimulación del propio sistema inmunológico del huésped (Perry y Tutt, 2015).

Para que haya adhesión de bacterias a la superficie dental, debe previamente haberse formado una película orgánica (película adquirida), la cual está constituida por los componentes de la saliva (glucoproteínas, polipéptidos, glúcidos). Horas después de su desarrollo, bacterias específicas como *Streptococcus sanguis* y *Actinomyces viscosus*, llegan a colonizar la película adquirida, saturando de forma progresiva la superficie y formando así un verdadero biofilm dental (Pibot y cols., 2009).

La placa supragingival se forma encima y a lo largo del margen gingival. Es detectada con facilidad al alcanzar un cierto grosor. Su formación se inicia en dos etapas, la primera involucra la adherencia bacteriana a la superficie dental y la segunda implica la maduración de las bacterias adheridas y la sucesión microbiana. Está compuesta de organismos aerobios Gram-positivos. Por su parte la placa subgingival, no puede ser diagnosticada directamente en el sitio, ya que se encuentra debajo del margen de la encía, dentro del surco gingival. La naturaleza de los microorganismos que colonizan el surco gingival y la bolsa periodontal difiere de la placa supragingival por estar compuesta de organismos anaeróbicos Gram-negativos (Logan, 2006).

Por otro lado, el cálculo dental es la forma mineralizada de la placa dental, difiere de esta porque su estructura contiene fosfato de calcio cristalizado y es producto de la actividad catalítica de algunas bacterias (Zambori y cols., 2012). Su depósito es tanto por encima como por debajo de la encía. El cálculo no contiene bacterias patógenas y su característica porosa favorece los nuevos depósitos de placa dental. Aunque no es el causante de la inflamación del periodonto, es uno de los factores agravantes (Pibot y cols., 2009).

1.4. Etiología de las enfermedades periodontales: especies bacterianas asociadas a enfermedad

Aunque la literatura referente a las enfermedades periodontales en gatos va adquiriendo relevancia en el campo de la investigación, aún es escasa. Muchos de los estudios revisados plantean como etiología de las enfermedades periodontales en el gato a las especies bacterianas negro-pigmentadas como las más prevalentes. Ciertos investigadores concluyen que, para las zonas más afectadas con enfermedades periodontales, las bacterias principalmente identificadas fueron anaerobios Gram-negativos, cocos Gram-positivos anaeróbicos, negro-pigmentados y bacteroides (Mallone y cols., 1988; Harvey, 2005).

Las bacterias de la placa dental están organizadas en *biofilms* microbianos, los cuales se componen por comunidades complejas de microorganismos. Se han identificado cantidades alrededor de 500 especies bacterianas en la boca de perros y gatos, tanto sanos como enfermos (Harvey y cols., 1995), pero sólo se han observado como agentes etiológicos una pequeña parte de los mismos (Nishiyama y cols., 2007). Las bacterias asociadas al *biofilm* en presencia de salud periodontal, son cocos y bacilos Gram-positivos, incluyendo *Streptococcus* spp. y *Actinomyces* spp., entre otros anaerobios facultativos (Harvey y cols., 1995). Así mismo, las bacterias asociadas a enfermedades periodontales están representadas en su mayoría por bacterias Gram-negativas anaerobias estrictas. En este tipo de bacterias se incluyen *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp., espiroquetas y *Fusobacterium* spp. La acción patogénica de estas bacterias agresivas es mucho más intensa debido a diversas enzimas, toxinas y productos de degradación (Fournier y cols., 2001; Pibot y cols., 2009).

Por tanto, las bacterias de la placa dental se componen de flora aerobia y anaerobia. La proporción de flora aerobia y anaerobia en la gingivitis es la misma tanto supragingival como subgingival, pero el volumen de la flora supragingival es 100 veces mayor que la de la flora subgingival. En presencia de periodontitis, el porcentaje de flora anaerobia Gram-negativa aumenta. Esto se debe a que las bacterias aerobias Gram-positivas evolucionan muy rápido, lo que lleva a la disminución del oxígeno pasando de 12-14% en la boca al 1-2% en el fondo del surco gingival. Por lo que estas nuevas condiciones, asociadas a fuentes de nutrientes variadas (degradación epitelial, alimento, degradación bacteriana), dan como resultado el desarrollo de una flora bacteriana anaerobia (Pibot y cols., 2009). Por ello, las unidades formadoras de colonias de anaerobios facultativos y estrictos son consideradas un predictor de enfermedades periodontales en gatos (Norris y Love, 1999).

Carreño y colaboradores (2010), cultivaron la flora subgingival de gatos con enfermedad periodontal (gingivitis), encontrando que los microorganismos más aislados eran anaerobios Gram-negativos en un 39%, específicamente *Porphyromonas* spp. y *Prevotella* spp. El segundo grupo correspondió al 29%

de aerobios Gram-positivos, principalmente *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp. Y el tercer grupo se caracterizó por un 27% de microorganismos aerobios Gram-negativos, mientras que el 5% restante correspondió a bacterias anaerobias Gram-positivas que en su mayoría fueron *Peptostreptococcus* spp.

Porphyromonas spp. es un género bacteriano con especies bacterianas anaerobias facultativas estrictas que representa el género bacteriano más estudiado (Norris y Love, 1999; 2000). La presencia de *Porphyromonas* spp. y el aumento de su prevalencia ha sido asociado con enfermedades periodontales y su severidad (Harvey y cols., 2005, Pérez-Salcedo y cols., 2013; Khazandi y cols., 2014). Concretamente, la especie *Porphyromonas gulae*, recientemente descubierta, fue aislada en el surco gingival de varios animales. Es un bacilo Gram-negativo que carece de motilidad y no forma esporas, además crece en forma de colonias negropigmentadas en un ambiente anaerobio estricto con metabolismo asacarolítico (Fournier y cols., 2001). También se han estudiado en gatos dos especies más de *Porphyromonas* adicionales a *P. gulae*, estas son *Porphyromonas circudentaria* y *Porphyromonas salivosa*. Se evaluó la correlación (R) entre las unidades formadoras de colonias de cada una de las especies, al mismo tiempo que el grado de las enfermedades periodontales, siendo R= 0,5 para *P. gulae*, 0,2 para *P. salivosa* y 0,1 para *P. circudentaria*, considerando a las tres especies como predictores de la enfermedad en gatos (Norris y Love 1999, 2000).

En un estudio con 32 gatos, se observó que *Bacteroides* negropigmentados y *Peptostreptococcus anaerobius* fueron más frecuentes en zonas afectadas por la enfermedad. Aunque *Pasteurella multocida* se encontró comúnmente en la boca de los gatos, no se asoció a enfermedad periodontal. Por el contrario, *P. gulae* y *Tannerella forsythia* han sido descritas como periodontopatógenos importantes (Perry y Tutt, 2015).

Otro estudio sugiere que *P. salivosa (macacae)* es un inmunógeno fuerte en la boca de los gatos y aparece en aquellos con enfermedades periodontales

más severas, ya que tienen mayor reactividad de los anticuerpos séricos a diversos antígenos de células enteras solubles incluyendo fimbrias de este organismo, que aquellas con enfermedades periodontales menos severas. Sugiriendo la importancia de *P. salivosa*, presente en los diferentes grados de enfermedades periodontales, y que tiene un alto potencial inmune en la boca de gatos, el cual es más alto al ser más severa la enfermedad (Norris y Love, 2001). Del mismo modo fue indicado que la presencia de *Porphyromonas* spp. debe ser tomado en cuenta en el tratamiento de las enfermedades periodontales de gatos domésticos (Norris y Love, 1999).

El patógeno *Fusobacterium nucleatum*, es un bacilo con forma de huso, no forma esporas, carece de motilidad y es un anaerobio Gram-negativo. No tiene fimbrias, flagelos ni pili, sin embargo, tiene una cápsula mucopolisacárida, la cual pudiera ser importante en su capacidad patogénica (Socransky y Haffajee, 2002). Se ha observado su presencia en abscesos subcutáneos en gatos, como el anaerobio identificado más frecuentemente. Sin embargo, su asociación o presencia con enfermedades periodontales es limitada (Hoshuyama y cols., 1996).

T. forsythia es un bacilo fusiforme, Gram-negativo y anaerobio, estricto que carece de movilidad (Socransky y cols., 1998). Ha sido aislada en mordeduras de gatos y perros, y se asocia a las enfermedades periodontales en gatos (Hudspeth y cols., 1999). La prevalencia en gatos sanos es de 89% en muestras analizadas mediante cultivo y de 98% en muestras analizadas mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR), mientras que está presente en el 100% de muestras analizadas con ambos métodos en gatos con enfermedades periodontales. Aunque la identificación de este patógeno es altamente elevada en gatos sanos y enfermos, la carga bacteriana de las unidades formadoras de colonias medida, fue significativamente mayor en gatos con enfermedades periodontales comparándolo con los sanos (Booij-Vrieling y cols., 2010).

1.5. Procedimientos de análisis microbiológico de bacterias periodontales en gatos

La técnica empleada para la toma de muestra microbiológica en animales ha sido habitualmente usando una torunda de algodón sobre el margen gingival (Love y cols., 1989). Diversos estudios realizados en gatos confirman el uso de esta técnica convencional (Love y cols., 1990; Booij-Vrieling y cols., 2010; Carreño y cols., 2014). Sin embargo, la toma de muestra subgingival con puntas de papel en gatos fue ya propuesta por Mallonee y cols. (1988), y el estudio realizado por Pérez-Salcedo y colaboradores (2011) demostró los mayores recuentos de anaerobios empleando la técnica de las puntas de papel, con una diferencia significativa de $p=0,03$ al ser comparadas con la torunda de algodón y una reducción notable de los falsos positivos para *P. gulae* (100% con puntas de papel y 80% torunda de algodón).

Para el procesamiento de muestras microbiológicas, la técnica de cultivo es el procedimiento habitual, ya que identifica microorganismos no buscados y brinda la posibilidad de evaluar susceptibilidades a antimicrobianos. El cultivo está compuesto por diferentes fases: toma de muestra, transporte, dispersión, elaboración de diluciones, incubación en medios de cultivo, identificación morfológica, recuento de tipos morfológicos y recuento total. La identificación de los microorganismos cultivados está basada en distintos criterios como la morfología de la colonia, el hallazgo en microscopio, la tolerancia al oxígeno y la caracterización bioquímica (Pérez-Salcedo y cols., 2015). Sin embargo, para lograr la identificación definitiva es necesario emplear técnicas de evaluación de secuencia de ADN.

La técnica de cultivo, presenta algunas limitaciones con respecto a la identificación de especies bacterianas (Pérez-Salcedo y cols., 2015), por ello estudios realizados por otros autores (Rudney y Larson., 1994; Mota y cols., 2006) emplearon técnicas moleculares para estudiar estas especies en muestras biológicas diferentes.

Por su parte, las técnicas moleculares permiten valorar especies importantes diferentes entre especies bacterianas semejantes. Por ejemplo, que *P. gulae* es semejante a *Porphyromonas gingivalis* del humano, y la actividad frente a la catalasa es diferente (Laliberte y Mayrand, 1983), así como la especificidad antigénica (Parent y cols., 1986), donde se sugiere que existen dos biotipos. Un análisis realizado sobre la secuencia del gen 16S rARN y los datos de hibridación ADN-ADN que demuestran que *Porphyromonas* de origen humano (*P. gingivalis*) es diferente de *Porphyromonas* de origen animal (*P. gulae*, *P. circudentaria*, *Odoribacter denticanis*, *Porphyromonas gingivicanis*) (Fournier y cols., 2001). La distinción de especies bacterianas es posible debido a técnicas de biología molecular. Estas técnicas hoy día son capaces de proporcionar identificación exacta y segura de los microorganismos analizados (Schlegel y cols., 2003).

Existen diferentes técnicas de biología molecular, que se realizan a partir de la extracción adecuada de ADN, uno corresponde a la técnica de PCR, y el análisis del fragmento de restricción de ADN ribosomal amplificado denominado ARDRA por sus siglas en inglés (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), ambos métodos son generales de identificación, tipificación, rápidas y eficientes (Grimont y Grimont, 1986).

Por tanto, el empleo de estas técnicas representa una ventaja para el reconocimiento de especies bacterianas, ya que, las enfermedades periodontales son de gran importancia en la salud de los gatos y la relevancia etiológica de los patógenos en ellos presentes, que pueden ser el posible vector de transmisión de infecciones orales en humanos.

2. JUSTIFICACIÓN

La caries dental y la periodontitis son enfermedades bucales muy prevalentes, siendo las principales causas de la pérdida dentaria en el hombre (Pihlström y cols., 2005). Las enfermedades periodontales, son muy relevantes en humanos, tanto que se considera un problema de salud pública en todo el mundo (Carasol y cols., 2016). La prevalencia se ha estimado desde un 47% en adultos con más de 30 años, llegando hasta un 85% en personas mayores de 65 años (Chung y cols., 2011; Eke y cols., 2012).

Por su parte, en gatos las enfermedades periodontales engloban un número de condiciones inflamatorias que afectan al periodonto del diente (Harvey y cols., 1983; Gorrel, 1998). Incluye la gingivitis, descrita como una condición reversible, la cual una vez controlada, remite y detiene el avance de la enfermedad, lo que no ocurre con la periodontitis, que es una enfermedad irreversible y de condición progresiva, ya que conlleva la destrucción de los tejidos de soporte (Perry y Tutt, 2015).

La prevalencia de las enfermedades periodontales en gatos, es alta, en algunos casos y como consecuencia del avance de la enfermedad a periodontitis, se presentan procesos sistémicos debido a las bacteriemias de origen periodontal, lo que puede producir endocarditis bacterianas, artritis sépticas, lesiones renales, bacterias del tracto respiratorio y un desmejoramiento del estado del animal en general que puede llevar a una muerte temprana (Harvey y Flax, 1992; DuPont, 1998; Remeus, 1999; Grandez y Guerrero, 2013).

Estas enfermedades bacterianas de etiología infecciosa son transmisibles, principalmente al ser humano, además de los graves problemas de salud que las especies animales pueden desarrollar (Bascones y Figueroa, 2005). El estudio de las especies bacterianas presentes en la boca de gatos asociadas a enfermedades periodontales es importante, no sólo en la prevención, el diagnóstico y tratamiento, sino también porque la presencia de

bacterias en animales de compañía es un reservorio de periodonto-patógenos (Booij-Vrieling y cols., 2010). Las especies bacterianas negro-pigmentadas, son de gran importancia en la etiología de las enfermedades periodontales en gatos. El género más estudiado es *Porphyromonas* spp., el cual se encuentra asociado a la severidad de la enfermedad (Norris y Love, 1999, 2000; Harvey , 2005).

El gato como animal de compañía dentro del entorno familiar, tiene ventajas, ya que además de satisfacer necesidades de orden afectivo, desempeña un rol importante en el control natural de los roedores (Acuña, 1998). Sin embargo, también tiene riesgos, ya que, tanto la especie canina como felina presentan aspectos negativos, siendo una de las principales la zoonosis, por la estrecha interacción con el grupo familiar (Landeros, 1988).

La prevención y el tratamiento de referencia son los procedimientos mecánicos de limpieza, aunque rápidos no dejan de ser una técnica invasiva, por su parte la limpieza manual, es tan eficaz como la limpieza ultrasónica, aunque implica más tiempo y fatiga (Perry y Tutt, 2015). Por su parte, los cuidados domésticos incluyen el cuidado activo, mediante el cepillado de los dientes del animal y el cuidado pasivo, que se caracteriza por administrar dietas específicas donde el objetivo es masticar, siendo este último el más sencillo y no requiere trabajo para el cuidador, caracterizándose por no ser invasivos (Niemieć, 2008).

3. OBJETIVOS

General

Evaluar el impacto microbiológico de la administración de un suplemento dental en gatos jóvenes con enfermedades periodontales, en comparación con un grupo control.

Específicos

Evaluar el impacto en la prevalencia de especies bacterianas periodontopatógenas, asociadas a las enfermedades periodontales en gatos jóvenes, después de la administración de un suplemento dental.

Evaluar el impacto en la cantidad total de bacterias y de especies bacterianas periodontopatógenas, asociadas a las enfermedades periodontales en gatos jóvenes, después de la administración de un suplemento dental.

Evaluar el impacto en la proporción de especies bacterianas periodontopatógenas, asociadas a las enfermedades periodontales en gatos jóvenes, después de la administración de un suplemento dental.

4. HIPÓTESIS

Hipótesis nula

No existen diferencias estadísticamente significativas, entre el grupo test y el control, en las variables microbiológicas analizadas (recuentos bacterianos totales y de especies bacterianas seleccionadas, proporciones y frecuencia de detección de las mismas), después de la administración de un suplemento dental en gatos jóvenes con enfermedades periodontales.

Hipótesis alternativa

Existen diferencias estadísticamente significativas, entre el grupo test y el control, en las variables microbiológicas analizadas (recuentos bacterianos totales y de especies bacterianas seleccionadas, proporciones y frecuencia de detección de las mismas), después de la administración de un suplemento dental en gatos jóvenes con enfermedades periodontales.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Diseño del estudio y animales empleados

Se realizó un estudio clínico aleatorizado (orden de asignación), controlado, cruzado, de 8 semanas de duración en cada periodo de estudio.

Se estudiaron 14 gatos domésticos (tipo europeo de pelo corto o largo). Los animales fueron de ambos sexos, en edades comprendidas de 1 a 8 años.

En este diseño cada sujeto sirve como su propio control, ya que pasa por los dos tratamientos experimentales (test y control) que están siendo estudiados durante periodos diferentes.

Para la realización del cruzado en este estudio, se realizaron dos periodos. Antes de dar inicio, se realizó una limpieza inicial a todos los gatos. A un grupo de siete gatos se le aplicó (primer periodo experimental) el tratamiento activo objeto de estudio (test) y al otro grupo, el tratamiento control. Transcurrido el periodo de aclaramiento (para eliminar cualquier efecto residual del tratamiento), se inició el segundo periodo experimental, y los gatos que habían recibido el tratamiento test en el primer periodo experimental recibieron el tratamiento control, y viceversa.

Cada periodo experimental tuvo una duración de 8 semanas, con un examen basal y uno final. El periodo de aclaramiento duró 4 semanas.

Cada gato usó un producto (test o control) en cada periodo de estudio, y el orden fue aleatorizado.

Entre cada periodo de estudio fueron tomadas muestras, por un Odontólogo en la empresa Affinity Petcare, que se colocaron en un vial sellado con una temperatura constante entre 4-8° C y enviadas al laboratorio de Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid para su análisis en las siguientes 24 horas.

Los gatos son propiedad de la empresa Affinity Petcare, quien a su vez realiza el estudio, ellos se encargan del cuidado de los gatos y cuentan con los permisos reglamentarios, haciendo atención a la normativa de experimentación animal actual.

5.2. Tratamiento

El producto de investigación empleado fue un suplemento dental, un complemento alimentario para mascotas “gatos”. Incluye ingredientes activos contra la placa dental, el cálculo y el mal olor oral. Por otra parte, el control fue la misma matriz, pero sin ingredientes activos.

Además, Affinity Petcare proporcionó una dieta estándar que incluye un producto seco sin ingredientes específicos de cuidado oral.

5.3. Visitas y evaluaciones

Para cada periodo de estudio, se programaron tres visitas:

- Evaluación inicial (V0), se realizó la evaluación inicial y la limpieza dental.
- Visita intermedia (V1), se realizó a las 4 semanas, sin evaluación microbiológica.
- Evaluación final (V2), se realizó a las 8 semanas.

Tras el periodo de aclaramiento (4 semanas), se llevó a cabo el segundo periodo de estudio, con las mismas visitas.

Durante la visita V0, se realizó una evaluación dental, una limpieza y pulido dental posterior profesional de los sujetos seleccionados, usando una anestesia de inhalación bien controlada, según procedimientos del sitio, monitorizando y registrando los parámetros vitales y manteniendo el fluido intravenoso terapia. Se tomaron radiografías y luego se realizó la limpieza y

pulido de los dientes siguiendo las indicaciones y pautas de la Asociación Americana del Hospital de Animales (AAHA).

5.4. Procedimiento del muestreo

Las muestras fueron recogidas con puntas de papel estéril (nº30, Maillefer, Suiza), que se pusieron en contacto con la región subgingival de los gatos. Se tomaron muestras de cuatro zonas por gato (pero todas ellas se procesaron conjuntamente, al ser recogidas en el mismo vial), una por cada cuadrante oral, y se tuvo en cuenta la profundidad del sondaje, la presencia de sangrado y la facilidad de acceso.

Se insertaron dos puntas consecutivas de papel en las bolsas/surcos gingivales de la forma más apical posible. Tras permanecer 10 segundos en la zona de inserción, las puntas de papel se introdujeron en viales con 1 ml de fluido de transporte reducido (RTF) (Tabla 1), lo que permitió que las muestras se mantuvieran en las condiciones adecuadas para ser cultivadas hasta 24 horas después de la recogida.

Producto	Proporción
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	0,045%
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	0,045%
Cloruro sódico (NaCl)	0,09%
Sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$)	0,09%
Sulfato de magnesio ($MgSO_4$)	0,02%
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	0,04%
Carbonato de sodio (Na_2CO_3)	0,04%
Ditiotreitol (DTT)	0,02%

Tabla 1. Componentes del fluido de transporte reducido (RTF).

5.5. Procesado de las muestras

El procesado de las muestras se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología (Universidad Complutense, Madrid).

Las muestras microbiológicas recibidas se homogeneizaron mediante agitación en vortex durante 30 segundos y se realizaron diluciones seriadas en tampón fosfato salino (PBS). Después, se sembraron alícuotas de 0,1 ml de las diluciones en placas con medio de cultivo agar sangre no selectivo (Blood Agar Base II®, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). El medio fue suplementado con 5 mg/L de hemina (Panreac-AppliChem, Barcelona, España), 1 mg/L de menadiona (Panreac-AppliChem) y 5% de sangre de caballo estéril (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra).

Posteriormente se incubaron de 7 a 14 días a 37°C tanto en condiciones aeróbicas como en condiciones de anaerobiosis (80% de N₂, 10% de CO₂ y 10% de H₂). Se realizaron recuentos totales y, además, en las placas anaerobias, recuentos de colonias representativas. Los recuentos fueron transformados en unidades formadoras de colonias (UFC) por ml de la muestra original.

Las colonias representativas consideradas fueron las de especies bacterianas negro pigmentadas (Figuras 1-2), que presentaban morfologías de patógenos diana, es decir, de bacterias características de enfermedades periodontales. Fue posible diferenciar las colonias de bacterias negro pigmentadas de otras colonias como las de *Fusobacterium* spp., por la morfología mostrada en la placa de cultivo (Figuras 3-4). Con el fin de confirmar si los microorganismos cultivados eran Gram positivos o negativos, las colonias sospechosas se identificaron estudiando la tinción de Gram.

Las morfologías de patógenos considerados para el estudio fueron: *Porphyromonas gingivalis*-like, *Prevotella intermedia*-like (en ambas se añade el sufijo “-like” para expresar que es solo una identificación en base a la morfología de colonia), *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*,

Campylobacter rectus, *Eikenella corrodens*, *Tannerella forsythia*, y *Capnocytophaga* spp. Estos microorganismos fueron diferenciados por sus características propias indicadas en la Tabla 2.

Especie bacteriana	Gram	Morfología
<i>Porphyromonas gingivalis</i> -like	(-)	Cocobacilo
<i>Prevotella intermedia</i> -like	(-)	Bacilo
<i>Parvimonas micra</i>	(+)	Coco
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	(-)	Filamentosa
<i>Campylobacter rectus</i>	(-)	Bacilo curvado (coma)
<i>Eikenella corrodens</i>	(-)	Bacilo
<i>Tannerella forsythia</i>	(-)	Bacilo
<i>Capnocytophaga</i> spp.	(-)	Bacilo fusiforme

Tabla 2. Características de las especies bacterianas estudiadas.

5.6. Análisis estadístico

La recogida de datos se efectuó en hojas tipo excel para su posterior análisis estadístico.

Las variables del recuento de bacterias aerobias y anaerobias (en UFC) se sometieron a una transformación logarítmica para su posterior análisis.

Las comparaciones inter- e intra-grupo se realizaron mediante test de la t de Student, para muestras pareadas. Las comparaciones inter-grupo (entre grupos test y control), se realizaron en los valores de las visitas basal y final, y en los cambios basal-final. Las comparaciones intra-grupo se realizaron entre la visita basal y final, dentro de cada grupo. Los tests se efectuaron a dos colas y la significación estadística se estableció con $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

Todos los gatos completaron todas las fases de estudio. Solamente un gato, en el periodo de uso del producto control, presentó recuentos nulos en la muestra anaerobia, por problemas técnicos.

6.1. Recuentos totales de aerobios y anaerobios

Los recuentos totales anaerobios (Tabla 3) aumentaron, de manera estadísticamente significativa, en ambos grupos, con un mayor incremento en el grupo control (-1,95) que en el grupo test (-1,61), aunque las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas.

Los valores basales y finales de los recuentos anaerobios tampoco demostraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (Tabla 4).

Los recuentos totales aerobios (Tabla 3) aumentaron, de manera estadísticamente significativa, en ambos grupos, y no hubo diferencias entre grupos.

Los valores basales y finales de los recuentos aerobios no demostraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (Tabla 4).

	Test			Control			Intergrupo**
	Media	Desviación Estándar	Valor p*	Media	Desviación Estándar	Valor p*	Valor p
Aerobios	-1,28	2,15	0,044	-1,16	1,93	0,042	0,8974
Anaerobios	-1,61	0,98	0,000	-1,95	1,93	0,002	0,6357

Tabla 3. Cambios entre la visita inicial y final (el valor negativo representa incremento, más cantidad en la visita final) en los logaritmos de las unidades formadoras de colonias (UFC) de recuentos totales de bacterias aerobias y anaerobias.

	Test		Control		Intergrupo*
	Media	Desviación Estándar	Media	Desviación Estándar	Valor p
Basal-aerobios	5,32	0,70	5,27	0,90	0,847
Basal-anaerobios	5,29	0,75	4,97	1,69	0,592
Final-aerobios	6,60	1,97	6,43	1,98	0,845
Final-anaerobios	6,90	0,56	6,92	0,59	0,952

Tabla 4. Logaritmos de las unidades formadoras de colonias (UFC) en las visitas basal y final en los recuentos totales de bacterias aerobias y anaerobias.

6.2. Frecuencia de detección de las especies bacterianas estudiadas

Los resultados de frecuencia de detección, mostraron altas frecuencias para tres de las especies bacterianas estudiadas (*P. gingivalis*-like, *P. intermedia*-like, *F. nucleatum*), tanto en la visita basal como final (Tabla 5). Mientras *P. gingivalis*-like y *P. intermedia*-like, mostraron una tendencia a incrementar su prevalencia entre las visitas basal y final, lo contrario ocurrió para *F. nucleatum*.

	Basal		Final	
	Test	Control	Test	Control
P. gingivalis-like	57,1%	50,0%	71,4%	50,0%
P. intermedia-like	78,6%	50,0%	85,7%	71,4%
F. nucleatum	57,1%	57,1%	50,0%	42,9%
T. forsythia	7,1%	0,0%	14,3%	0,0%
Capnocytophaga spp.	0,0%	0,0%	0,0%	7,1%
Otras	0,0%	0,0%	7,1%	7,1%

Tabla 5. Frecuencia de detección de las especies bacterianas seleccionadas.

6.3. Recuentos de las especies bacterianas estudiadas

Los recuentos de las especies bacterianas (Tabla 6) aumentaron, de manera estadísticamente significativa, en ambos grupos, con un mayor incremento en el grupo test *P. intermedia*-like (-750.771) que en el grupo control (-632.207), *F. nucleatum* (-91.129) en comparación al control (-20.993) y *T. forsythia* (-6.429) que en el grupo control (0), para *P. gingivalis*-like el incremento fue mayor en el grupo control (-607.414) en comparación al grupo test (-381.600), aunque las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas.

Los valores basales y finales de las unidades formadoras de colonias (UFC) no demostraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (Tabla 7). Sin embargo, hubo un incremento en los valores finales para el grupo control de la especie bacteriana *P. gingivalis*-like, así como en el grupo test para las especies bacterianas *P. intermedia*-like, *F. nucleatum* y *T. forsythia*.

	Test			Control			Intergrupo**
	Media	Desviación Estándar	Valor* P	Media	Desviación Estándar	Valor* P	Valor p
Pg	-381600	571185	0,027	-607414	1128024	0,065	0,4742
Pi	-750771	1341645	0,056	-632207	927178	0,024	0,7446
Fn	-91129	184494	0,087	-20993	197609	0,697	0,3121
Tf	-6429	20232	0,256	0	0	0	0,2558
Cap	0	0	0	-71	267	0,336	0,3356
Otras	-1429	5345	0,336	-857	3207	0,336	0,7452

Tabla 6. Cambios entre la visita inicial y final (el valor negativo representa incremento, más cantidad en la visita final) en las unidades formadoras de colonias (UFC) de diferentes especies bacterianas: *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*-like; *Pi*: *Prevotella intermedia*-like; *Fn*: *Fusobacterium nucleatum*; *Tf*: *Tannerella forsythia*; *Cap*: *Capnocytophaga* spp.

	Test		Control		Intergrupo*
	Media	Desviación Estándar	Media	Desviación Estándar	Valor p
Basal-Pg	31971	83460	37657	73562	0,863
Basal-Pi	32800	52255	16150	34622	0,391
Basal-Fn	7443	15788	51864	167050	0,346
Basal-Tf	714	2673	0	0	0,336
Basal-Cap	0	0	0	0	0
Basal-otras	0	0	0	0	0
Final-Pg	413571	575668	645071	1102664	0,433
Final-Pi	783571	1368922	648357	947899	0,719
Final-Fn	98571	185259	72857	138421	0,676
Final-Tf	7143	19779	0	0	0,200
Final-Cap	0	0	71	267	0,336
Final-otras	1429	5345	857	3207	0,745

Tabla 7. Unidades formadoras de colonias (UFC) en las visitas basal y final en los recuentos de las especies bacterianas seleccionadas: *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*-like; *Pi*: *Prevotella intermedia*-like; *Fn*: *Fusobacterium nucleatum*; *Tf*: *Tannerella forsythia*; *Cap*: *Capnocytophaga* spp.

6.4. Proporciones sobre la flora total de las especies bacterianas estudiadas

Las proporciones sobre la flora total de las especies bacterianas (Tabla 8) aumentaron en ambos grupos, con un mayor incremento en el grupo control de *P. intermedia*-like (-8,25) que en el grupo test (0,45) al mismo tiempo que hubo un mayor incremento de *P. gingivalis*-like (-3,10) en el grupo test que en el grupo control (-1,07), aunque las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas.

Los valores basales y finales del grupo test no demostraron diferencias estadísticamente significativas, en el grupo control hubo un incremento en el valor final para la bacteria *P. intermedia*-like en comparación al grupo test (Tabla 9).

	Test			Control			Intergrupo**
	Media	Desviación Estándar	Valor p*	Media	Desviación Estándar	Valor p*	Valor p
Pg	-3,10	12,87	0,383	-1,07	18,17	0,830	0,7239
Pi	0,45	13,15	0,900	-8,25	19,68	0,141	0,2054
Fn	0,95	4,74	0,466	3,54	6,96	0,079	0,2322
Tf	-0,10	1,67	0,833	0	0	0	0,8326
Cap	0,00	0,00	0	-0,01	0,05	0,336	0,3356
Otras	-0,13	0,50	0,336	-0,15	0,58	0,336	0,9237

Tabla 8. Cambios entre la visita inicial y final (el valor negativo representa incremento, más cantidad en la visita final) en las proporciones sobre la flora total de diferentes especies bacterianas: *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*-like; *Pi*: *Prevotella intermedia*-like; *Fn*: *Fusobacterium nucleatum*; *Tf*: *Tannerella forsythia*; *Cap*: *Capnocytophaga* spp.

	Test		Control		Intergrupo*
	Media	Desviación Estándar	Media	Desviación Estándar	Valor p
Basal-Pg	3,81	5,24	5,44	11,01	0,614
Basal-Pi	8,42	12,37	4,47	7,20	0,379
Basal-Fn	2,18	5,59	4,21	7,50	0,419
Basal-Tf	0,32	1,19	0,00	0,00	0,336
Basal-Cap	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Basal-otras	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Final-Pg	6,91	10,67	6,51	12,17	0,932
Final-Pi	7,97	11,12	12,72	17,96	0,452
Final-Fn	1,23	2,20	0,66	0,93	0,420
Final-Tf	0,41	1,05	0,00	0,00	0,165
Final-Cap	0,00	0,00	0,01	0,05	0,336
Final-otras	0,13	0,50	0,15	0,58	0,924

Tabla 9. Proporciones sobre la flora total de en las visita basal y final en los recuentos de las especies bacterianas seleccionadas: *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*-like; *Pi*: *Prevotella intermedia*-like; *Fn*: *Fusobacterium nucleatum*; *Tf*: *Tannerella forsythia*; *Cap*: *Capnocytophaga* spp.

7. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio fue evaluar el impacto microbiológico de la administración de un suplemento dental en gatos jóvenes con enfermedades periodontales, en comparación con un grupo control. En el presente estudio se observaron pocos cambios en el aspecto microbiológico, ya que no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Los recuentos totales de anaerobios y aerobios mostraron un aumento de manera estadísticamente significativa tanto en el grupo test como el grupo control, sin embargo, las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas.

En cuanto a la frecuencia de detección de las especies bacterianas, los resultados mostraron altas frecuencias para tres de las especies estudiadas (*P. gingivalis*-like, *P. intermedia*-like, *F. nucleatum*) en la visita basal y final. Mientras *P. gingivalis*-like y *P. intermedia*-like mostraron una tendencia a incrementar su prevalencia entre basal y final, lo contrario ocurrió para *F. nucleatum*, que disminuyó.

Respecto a los resultados para las especies bacterianas, la tendencia fue de aumentar en ambos grupos, con un mayor incremento en el grupo test *P. intermedia*-like, *F. nucleatum* y *T. forsythia*, para *P. gingivalis*-like el incremento fue mayor en el grupo control que en el grupo test, aunque las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas.

En relación a las proporciones, los recuentos sobre la flora total de las especies bacterianas aumentaron en ambos grupos, con un mayor incremento de dos de las especies estudiadas, en el grupo control fue *P. intermedia*-like y para el grupo test el mayor incremento fue de *P. gingivalis*-like, a pesar que las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas.

Las enfermedades periodontales en gatos, engloban un número de condiciones inflamatorias que afectan al periodonto del diente (Harvey y cols., 1983; Gorrel, 1998). Las bacterias negro pigmentadas son consideradas relevantes en estas enfermedades, estas bacterias están representadas en su mayoría por bacterias Gram negativas anaerobias estrictas, que incluyen *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp., espiroquetas y *Fusobacterium* spp. (Mallone y cols., 1988; Norris y Love, 1999; Booij-Vrieling y cols., 2010). Así lo demuestran también los resultados encontrados en este estudio, ya que se pudo observar que los recuentos totales anaerobios aumentaron de manera estadísticamente significativa en ambos grupos, con un mayor incremento en el grupo control que en el grupo test. Adicionalmente se muestra una mayor frecuencia de detección de las especies bacterianas para *P. gingivalis*-like, *P. intermedia*-like y *F. nucleatum*.

En este estudio la frecuencia de detección de las especies bacterianas fueron muy bajas para *T. forsythia* (sólo un gato mostró positivo, con una prevalencia de 0,07%), resultado que concuerda con el estudio realizado por (Pérez-Salcedo y cols., 2013), en el que la frecuencia de detección y la proporción media de esta misma especie fue muy baja (tres gatos positivos, con una prevalencia de 6%), pero, al comparar con otro estudio, realizado por Booij-Vrieling y colaboradores, (2010), mostró una prevalencia alta del 98% en gatos con periodontitis y el 89% en gatos sanos. Sin embargo, esta diferencia se puede deber en primer lugar a las diferentes técnicas empleadas para la toma de muestras: en este estudio se realizó con puntas de papel en la región subgingival de los gatos, mientras que Booij-Vrieling y colaboradores, (2010) usaron la torunda de algodón. En segundo lugar, las muestras microbiológicas en este estudio fueron procesadas por cultivo al igual que el estudio realizado por Pérez-Salcedo y colaboradores, (2013), mientras el otro estudio (Booij-Vrieling y cols., 2010), realizó el análisis mediante la identificación bacteriana por técnicas moleculares (PCR).

Aunque la técnica más empleada para la toma de muestra en animales ha sido con torundas de algodón (Norris y Love, 1999; Booij-Vrieling y cols. 2010). En este estudio se empleó la técnica a través de puntas de papel, ya

que es más específica para la detección y recuento de especies bacterianas, como fue demostrado en el estudio realizado por (Pérez-Salcedo y cols., 2013), en el cual se demostró que la toma de muestras subgingival con puntas de papel mejoraba el recuento de las especies bacterianas en gatos con enfermedades periodontales.

En este estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, sin embargo, no se puede concluir con seguridad que el efecto del suplemento dental no es real, por lo que pueda estar relacionado al tamaño del efecto y del tamaño de la muestra. Al tratarse de un suplemento dental, por una parte, el efecto que este puede ejercer no es agresivo, como pudiera ser la aplicación de un antibiótico o clorhexidina, por ejemplo. Por otra parte, la muestra de estudio fueron animales domésticos, en los cuales la flora bacteriana de la boca es variable y no existe un patrón aprobado científicamente que indique disminución o aumento de las especies una vez administrado un suplemento dental. Del mismo modo, el tamaño de la muestra ($n=14$) pudo haber influido en los resultados obtenidos.

Del mismo modo, al no encontrarse estudios previos científicamente aprobados, que evalúen la administración de suplementos dentales en gatos con enfermedades periodontales, y partiendo de que pueden ser el posible vector de transmisión de infecciones orales en humanos, es necesario dar continuidad a este tipo de investigaciones, las cuales podrían tener la posibilidad de ser un avance para la ciencia, además de servir como base para desarrollar estudios posteriores.

A la hora de interpretar los resultados, se deben de tener en cuenta las limitaciones de este estudio: limitado tamaño muestral, incompleta identificación de las especies bacterianas (pendiente de la identificación definitiva a nivel molecular), o el uso de tecnología de cultivo con sus limitaciones asociadas.

8. CONCLUSIONES

- ✓ El suplemento dental evaluado no tuvo un impacto a nivel de las cantidades, proporciones o prevalencias de bacterias periodonto-patógenas.
- ✓ La prevalencia de las especies bacterianas *P. gingivalis*-like y *P. intermedia*-like aumentó tanto en controles como en los tests, mientras que la de *F. nucleatum* disminuyó.
- ✓ El recuento total y el de las especies *P. intermedia*-like, *F. nucleatum*, *T. forsythia* y *P. gingivalis*-like aumentaron durante el tratamiento en ambos grupos, siendo mayor el incremento en el grupo control.
- ✓ Las proporciones sobre la flora total de las especies bacterianas que mayor incremento presentaron fueron *P. intermedia*-like en el grupo control, y *P. gingivalis*-like en el grupo al que se le aplicó el tratamiento.

9. REFERENCIAS

- Acuña, P. (1998) Demografía canina y felina en el Gran Santiago, 1997. Memoria. *Título Médico Veterinario*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 82 p.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology*; 4(1), 1-6.
- Armitage, G. C. (2005) Diagnóstico y clasificación de las enfermedades periodontales. *Periodontology 2000*; 9, 9-21.
- Bascones Martínez, A., Figuero Ruiz, E. (2005). Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*; 17(3), 111-118.
- Booij-Vrieling, H. E., van der Reijden, W. A., Houwers, D. J., de Wit, W. E., Bosch- Tijhof, C. J., Penning, L. C., van Winkelhoff, A. J., Hazewinkel, H. A. (2010) Comparison of periodontal pathogens between cats and their owners. *Veterinary Microbiology*; 144, 147-152.
- Carasol, M., Llodra, J.C., Fernandez-Meseguer, A., Bravo, M., Garcia-Margallo, M.T., Calvo-Bonacho, E., Sanz, M., Herrera, D. (2016) Periodontal conditions among employed adults in Spain. *Journal of Clinical Periodontology*; 43, 548–556.
- Carreño, C., Lorteo, M., Valenzuela, M. (2010) Estudio clínico-patológico en gatos con gingivitis-estomatitis. *Hospitales veterinarios*; 2(1). 5-12.
- Cave, N. J., Bridges, J. P., Thomas, D. G. (2012) Systemic effects of periodontal disease in cats. *Veterinary Quarterly*; 32(3-4), 131-144.
- Chung, S. Y., Song, K. B., Lee, S. G., Choi, Y. H. (2011) The strength of age effect on tooth loss and periodontal condition in Korean elderly. *Archives of Gerontology and Geriatrics*; 53, e243–e248.
- Cleland, W. P. (2000) Nonsurgical periodontal therapy. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*; 15(4), 221-225.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., Lappin-Scott, H. M. (1995) Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*; 49, 711-745.

De Bowes, L. J. (2002) Odontología. Aspectos Periodontales. Tratado de medicina interna veterinaria: enfermedades del perro y el gato. Pp. 1249–1258. Editorial Inter- Médica; Buenos Aires, Argentina.

Dillon, A.R. (1989) La cavidad oral. Gastroenterología canina y felina. Pp 1-15. Editorial Inter- Médica; Buenos Aires, Argentina.

DuPont, G. A. (1998) Prevention of periodontal disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*; 28(5), 1129-1145.

Dye, B. A. (2012) Global periodontal disease epidemiology. *Periodontology 2000*; 58(1), 10-25.

Eke, P. I., Page, R. C., Wei, L., Thornton-Evans, G., Genco, R. J. (2012) Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *Journal of Periodontology*; 83, 1449–1454.

Fournier, D., Mouton, C., Lapierre, P., Kato, T., Okuda, K., Menard, C. (2001) *Porphyromonas gulae* sp. nov., an anaerobic, gram-negative coccobacillus from the gingival sulcus of various animal hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 51, 1179-1189.

Frencken, J. E., Sharma, P., Stenhouse, L., Green, D., Lavery, D., Dietrich, T. (2017) Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. *Journal of Clinical Periodontology*; 44 (18): S94–105.

Frost, P., Williams, C. A. (1986) Feline dental disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*; 16(5), 851-873.

Gioso, M. (2003) Enfermedades periodontales. Patogenia, diagnóstico, tratamiento y prevención. 1er Seminario de Odontología Veterinaria. Temuco, Chile. 15 p.

Gorrel, C. (1998) Periodontal disease and diet in domestic's pets. *Journal of Nutrition*; 128, 2712S-2714S.

Grandez, R., Guerrero, H. (2013) Prevalencia de enfermedades dentales en gatos (*Felis catus*) de los distritos del cono norte de Lima. *Salud y Tecnología Veterinaria*; 1, 33-39.

Grimont, F., Grimont, P. A. (1986) Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Annales de l'Institut Pasteur Microbiologie* 137B, 165-175.

Groves, M., Harrington, K., Taboada, J. (2000) Frequently asked questions about zoonoses. Textbook of veterinary internal Medicine. 5th edition Pp. 382-390. Editorial W.B. Saunders Company; Philadelphia, USA.

Harvey, C. E. (2005). Management of periodontal disease: understanding the options. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*; 35(4), 819-836.

Harvey, C. E., Flax, B. M. (1992) Feline oral-dental radiographic examination and interpretation. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*; 22, 1279-1295.

Harvey, C. E., O'brien, J., Rossman, L., Stoller, N. (1983) Oral, dental, pharyngeal, and salivary gland disorders. 2nd edition. Vol 2. Pp.1126-1153. Editorial W.B. Saunders Company; Philadelphia, U.S.A.

Harvey, C. E., Thornsberry, C., Miller, B. R. (1995) Subgingival bacteria—comparison of culture results in dogs and cats with gingivitis. *Journal of Veterinary Dentistry*; 12, 147-150.

Holmstrom, S. E. (1998) Canine dental disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*; 28(5), 1049-1056.

Hoshuyama, S., Kanoe, M., Amimoto, A. (1996) Isolation of obligate and facultative anaerobic bacteria from feline subcutaneous abscesses. *Journal of Veterinary Medical Science*; 58, 273-274.

Hudspeth, M. K., Hunt Gerardo, S., Maiden, M. F., Citron, D. M., Goldstein, E. J. (1999) Characterization of *Bacteroides forsythus* strains from cat and dog bite wounds in humans and comparison with monkey and human oral strains. *Journal of Clinical Microbiology*; 37, 2003-2006.

Khazandi, M., Bird, P. S., Owens, J., Wilson, G., Meyer, J. N., Trott, D. J. (2014) In vitro efficacy of cefovecin against anaerobic bacteria isolated from subgingival plaque of dogs and cats with periodontal disease. *Anaerobe*; 28, 104-108.

Laliberte, M., Mayrand, D. (1983) Characterization of black-pigmented *Bacteroides* strains isolated from animals. *Journal of Applied Bacteriology* 55, 247-252.

Landeros, L. (1988) Estudio retrospectivo de diagnósticos caninos, en una clínica veterinaria del Gran Santiago, 1981-1985. *Memoria de Título*. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Lasa, I., Del Pozo, J. L., Penades, J. R., Leiva, J. (2005) Biofilms bacterianos e infección. *In Anales del Sistema Sanitario de Navarra*; 28(2), 163-175.

Linden, J. G., Herzberg, C.M. (2013) Periodontitis and systemic diseases: a record of discussions of working group 4 of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Clinical Periodontology*; 40 (Suppl. 14): S20-S23.

Löe, H., Theilade, E., Jensen, S. B. (1965) Experimental gingivitis in man. *Journal of Periodontology*; 36(3), 177-187.

Logan, E. I. (2006) Dietary influences on periodontal health in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*; 36, 1385-1401.

Logan, E. I., Wiggins, R. B., Zetner, K., Hefferren, J. J. (2000) Enfermedad dental. En: Hand MS, Thatcher CD, Remillard RL, Roudebush P. Nutrición clínica en pequeños animales. 4ª edición. Pp. 561- 584. Editorial Mark Morris Institute; Santa Fe de Bogotá, Colombia.

Love, D. N., Johnson, J. L., Moore, L. V. H. (1989) Bacteroides species from the oral cavity and oral-associated diseases of cats. *Veterinary Microbiology*; 19(3), 275-28.

Love, D. N., Vekselstein, R., Collings, S. (1990) The obligate and facultatively anaerobic bacterial flora of the normal feline gingival margin. *Veterinary Microbiology*; 22(2-3), 267-275.

Mallonee, D. H., Harvey, C. E., Venner, M., Hammond, B. F. (1988) Bacteriology of periodontal disease in the cat. *Archives of Oral Biology*; 33, 677-683.

Mota, R. M., Moreira, J. L., Souza, M. R., Horta, M. F., Teixeira, S. M., Neumann, E., Nicoli, J. R., Nuñez, A. C. (2006) Genetic transformation of novel isolates of chicken Lactobacillus bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. *BMC Biotechnology*; 6(1), 2. 1-11.

Niemiec, B. A. (2008) Periodontal therapy. *Topics in Companion Animal Medicine*; 23, 81-90.

Nieves, M.A., Hartwig, P., Kinyin, J. M., Riedesel, D.H. (1997) Bacterial isolates from plaque and from blood during and after routine dental procedures in dogs. *Veterinary Surgery*; 26, 26-32.

Nishiyama, S., Andrade, G., Gioso, M., Avila-Campos, M. (2007) Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens of dogs. *Brazilian Journal of Microbiology*; 38, 23-28.

Norris, J. M., Love, D. N. (1999) Associations amongst three feline *Porphyromonas* species from the gingival margin of cats during periodontal health and disease. *Veterinary Microbiology*; 65, 195-207.

Norris, J. M., Love, D. N. (2000) The association of two recombinant proteinases of a feline strain of *Porphyromonas gingivalis* with periodontal disease in cats. *Veterinary Microbiology*; 71, 69-80.

Norris, J. M., Love, D. N. (2001) Serum antibody responses of cats to soluble whole cell antigens and isolated fimbriae of feline *Porphyromonas salivosa* (macacae) and associations with periodontal disease. *Veterinary Microbiology*; 79, 225-237.

Parent, R., Mouton, C., Lamonde, L., Bouchard, D. (1986) Human and animal serotypes of *Bacteroides gingivalis* defined by crossed immunoelectrophoresis. *Infection and Immunity*; 51, 909-918.

Pérez-Salcedo, L., Herrera, D., Esteban-Saltiveri, D., Leon, R., Jeusette, I., Torre, C., O'Connor, A., González, I., Sanz, M. (2011) Comparison of two sampling methods for microbiological evaluation of periodontal disease in cats. *Veterinary Microbiology*; 149, 500-503.

Pérez-Salcedo, L., Herrera, D., Esteban-Saltiveri, D., Leon, R., Jeusette, I., Torre, C., O'Connor, A., González, I., Sanz, M. (2013) Isolation and identification of *Porphyromonas spp.* and other putative pathogens from cats with periodontal disease. *Journal of Veterinary Dentistry*; 30, 208-213.

Pérez-Salcedo, L., Laguna, E., Sánchez, M. C., Marín, M. J., O'Connor, A., González, I., Sanz, M., Herrera, D. (2015) Molecular identification of black-pigmented- 58. bacteria from subgingival samples of cats suffering from periodontal disease. *Journal of Small Animal Practice*; 56, 270-275.

Perry, R., Tutt, C. (2015) Periodontal disease in cats: back to basics--with an eye on the future. *Journal of Feline Medicine and Surgery*; 17, 45-65.

Petersen, P. E., Ogawa, H. (2012) The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontology 2000*; 60(1), 15-39.

Pibot, P., Elliott, V., Pibot, D., Biourge, V., Elliott, D. (2009) Enciclopedia de la nutrición clínica felina (No. 619: 636.045). Editorial Royal Canin.

Pihlström, B. L., Michalowicz, B. S., Johnson, N. W. (2005) Periodontal diseases. *The Lancet*; 366(9499), 1809-1820.

Remeus, P. (1999) Odontología restauradora en pequeños carnívoros. Manual de odontología en pequeños animales. Pp. 207-227. Editorial Harcourt, España.

Rudney, J. D., Larson, C. J. (1994) Use of restriction fragment polymorphism analysis of rRNA genes to assign species to unknown clinical isolates of oral viridans streptococci. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 437-443.

Sanz, M., van Winkelhoff, A.J. (2011) Periodontal infections: understanding the complexity—consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*; 38 (s11), 3-6.

Schlegel, L., Grimont, F., Grimont, P. A., Bouvet, A. (2003) Identification of major Streptococcal species by *rrn*-amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Journal of Clinical Microbiology*; 41, 657-666.

Slatter, D. (1997) Introducción a la odontología veterinaria. En: Manual de cirugía de pequeñas especies. Pp. 918-921. Editorial McGraw-Hill Interamericana; Ciudad de México, México.

Socransky, S. S., Haffajee, A. D. (2002) Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*; 28, 12-55.

Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., Kent, R. L. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*; 25, 134-144.

Watson, A. D. J. (1994) Diet and periodontal disease in dogs and cats. *Australian Veterinary Journal*; 71(10), 313-318.

Zambori, C. Tirziu, E, Nichita, I. Cumpanasoiu, C. Valentin, R. G. Seres, M. Mladin, B. Mot, D. (2012) Biofilm Implication in Oral Diseases of Dogs and Cats. *Animal Science and Biotechnologies*; 45 (2), 208-212.

FIGURAS

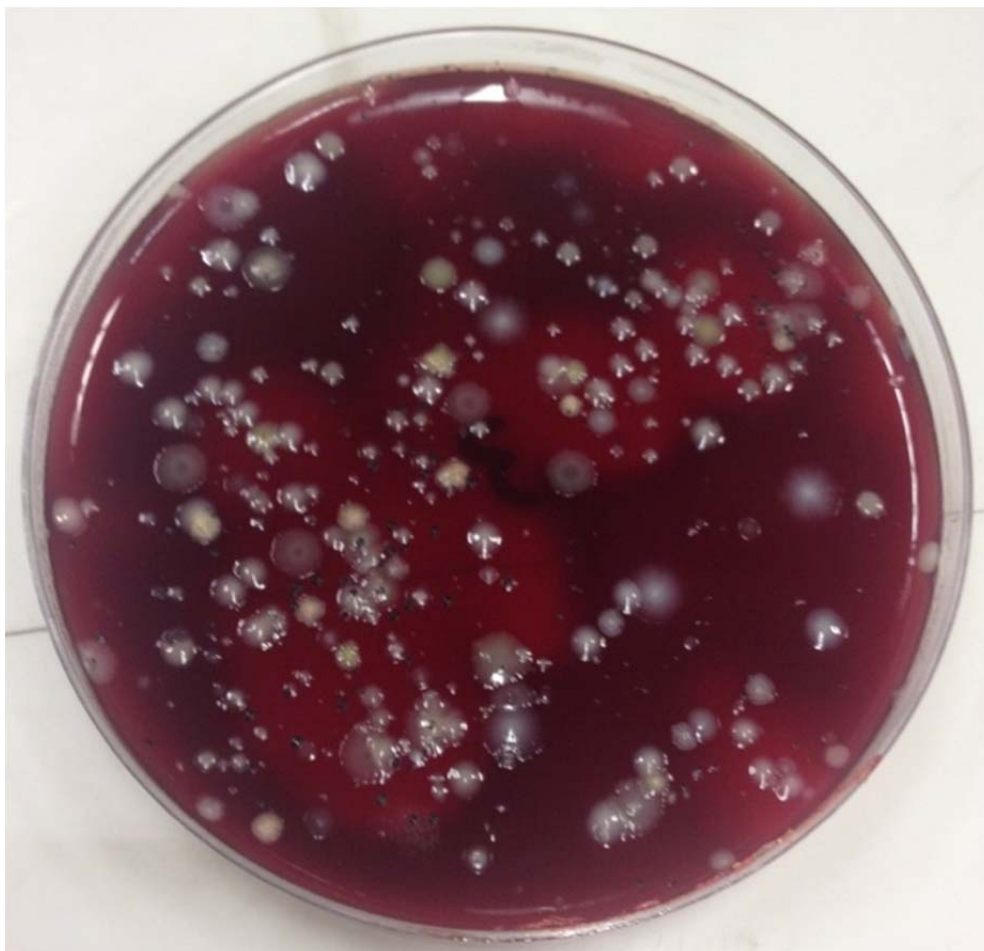


Figura 1. Cultivos bacterianos. Placa de cultivo con abundantes colonias de bacterias negro pigmentadas junto con colonias de otras bacterias.

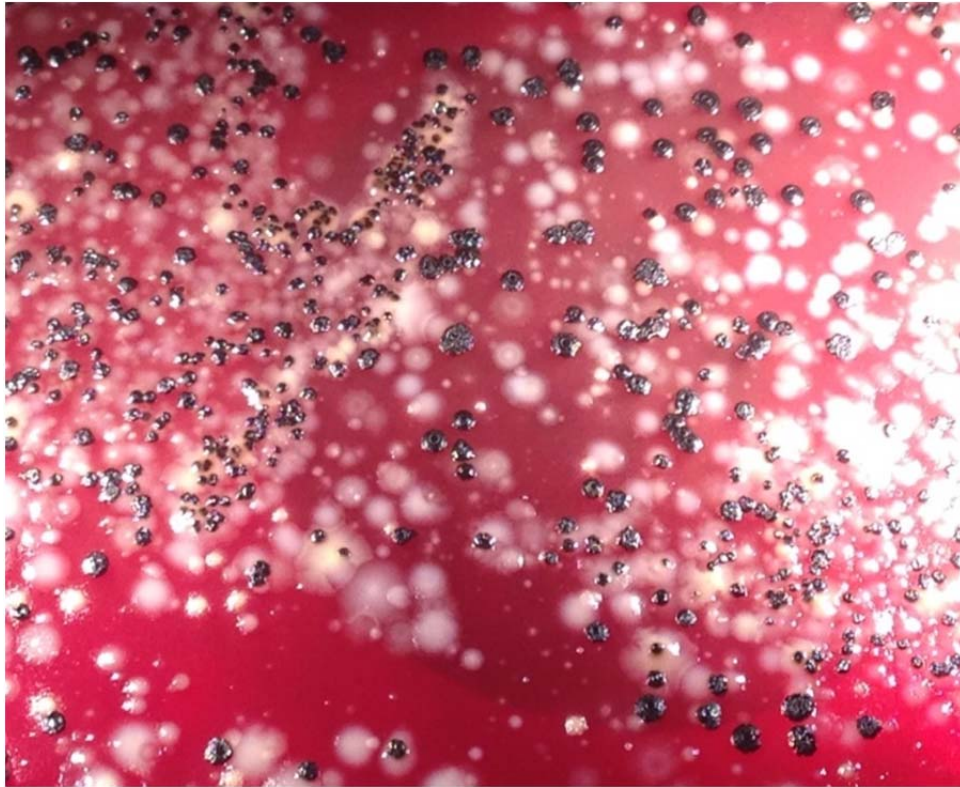


Figura 2. Ampliación de la placa anterior, las colonias de bacterias negro pigmentadas se diferencian por su tono marrón-negro frente al color blanco de las colonias de otras bacterias.

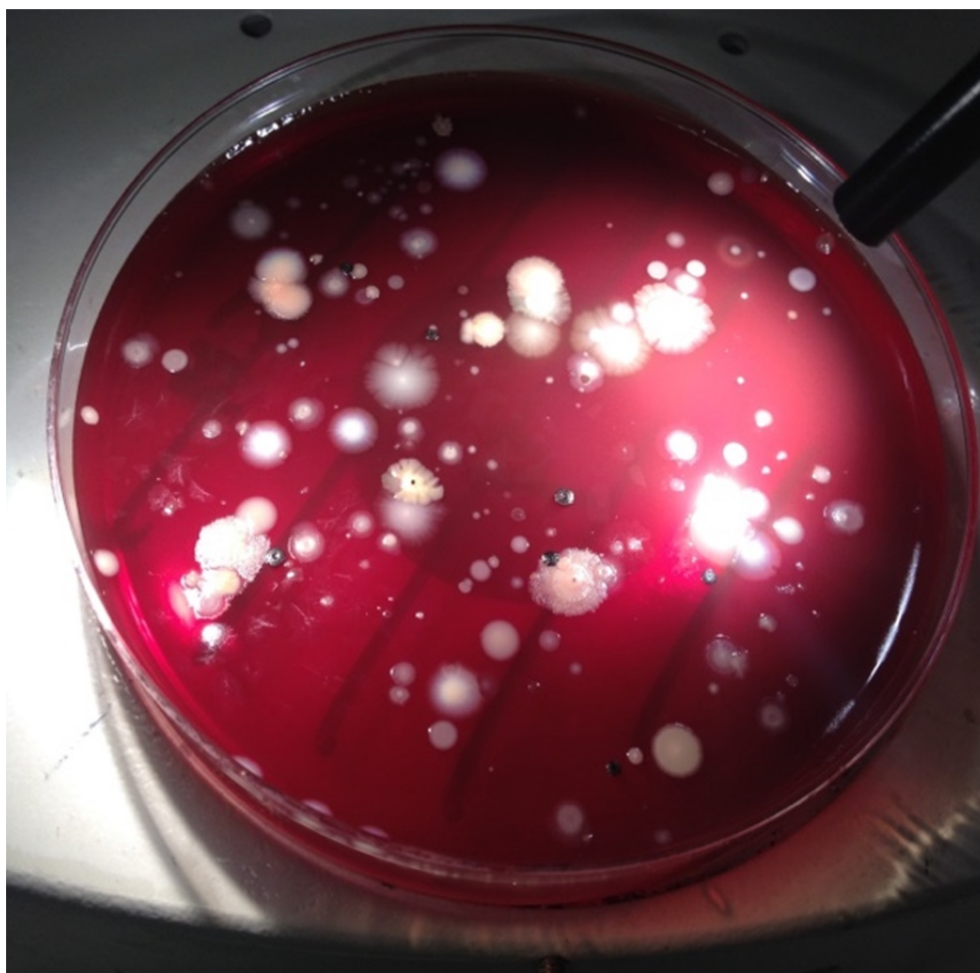


Figura 3. Placa de cultivo donde se visualizan colonias de bacterias negro pigmentadas y de *Fusobacterium* spp.

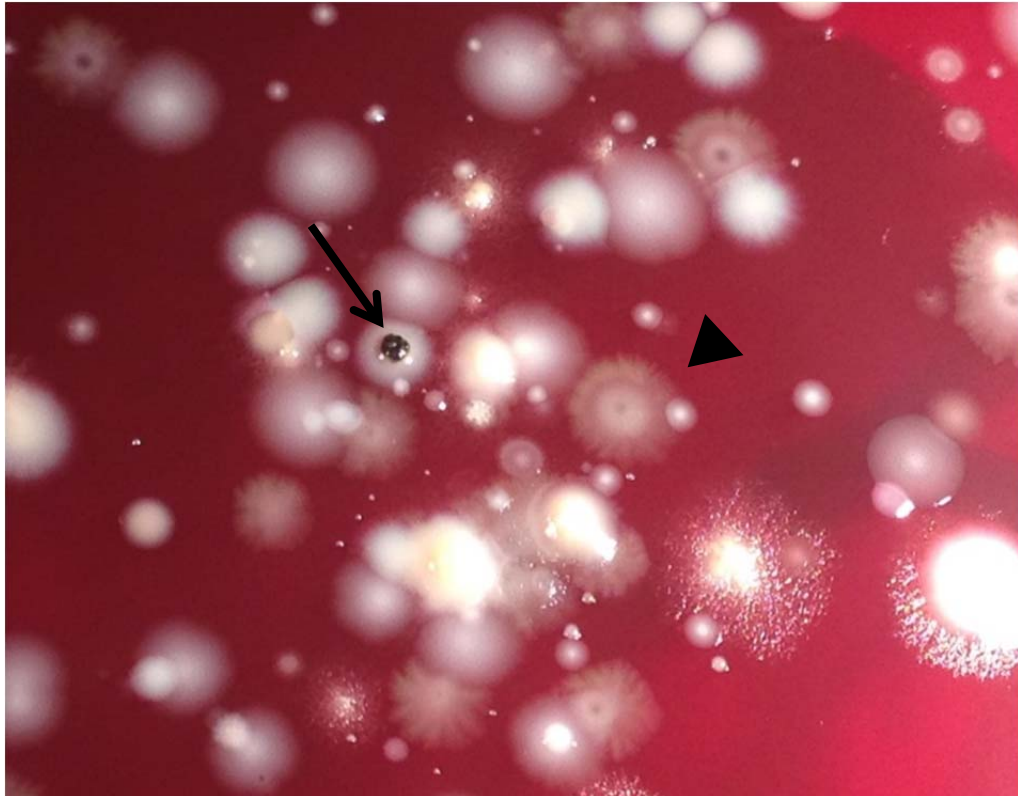


Figura 4. Ampliación de la placa anterior; la flecha indica una colonia de bacterias negro pigmentadas y la cabeza de flecha una colonia de *Fusobacterium* spp.